

6 高病原性鳥インフルエンザ等の競合エライザ法

における重要管理点の設定

○八町 慶史 桑山 隆実 綾部 文香 近藤 裕子

要 約

家畜保健衛生所の検査技術等の高位平準化が求められている中、高病原性鳥インフルエンザ等の競合エライザ法による検査キットの作業工程ごとに結果に影響を与える因子を分析し、その結果に基づいて検証試験を行った。陰性検体に指示陽性血清を段階希釈して混入させた結果、5倍希釈以下で陽転した。2回目の洗浄後、陽性検体に段階希釈した標識抗体を混入させた結果、2,102倍希釈以下で陰転した。標識抗体の混入が結果に影響を与えるリスクが高いことが示唆されたため、2,000倍希釈量の標識抗体が混入した洗浄液で2回目の洗浄を実施した結果、通常洗浄時と比較しS/N比が上昇した。プレートの洗浄液等を除去する際にバケツ中に溜まった廃液の飛散範囲を確認した結果、勢いよく除去するとプレートへの跳ね返り及びバケツの外側への飛散を確認した。以上より2回目の洗浄を重要管理点に設定し、標識抗体のプレートと洗浄液への混入対策を標準業務手順書に反映し、当所の検査の信頼性確保を図っていく。

八全国の家畜保健衛生所では、家畜の伝染性疾患の清浄性確保及び家畜疾患の診断体制に対する輸出先国の信頼を確保する観点から、検査技術等の高位平準化が求められている。現在、高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザを早期に摘発するため、エライザ法による抗体検査を実施しているが、今回、新たな競合エライザ法による検査キット（IDEXX インフルエンザ A エリーザキット、アイデックスラボラトリーズ(株)、アメリカ）が発売されたため、本キットの各作業工程で結果に影響を与える因子を分析した。本キットは検体中の測定抗体が多いと吸光度は低値となり、陽性と判定し、測定抗体が少ないと吸光度は高値となり、陰性と判定する（図1）。このため測定抗体と同等の指示陽性血清（ポジコン）及び発色に関与する標識抗体の混入が検査結果に影響

を与えると考え、リスクの度合いを比較し、その結果を基にリスクの高いほうの混入経路を検証した。

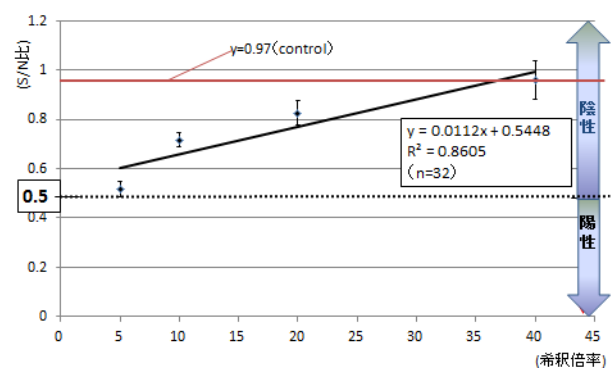


図1 ポジコンを混入させた場合のS/N比

材料及び方法

ポジコン混入の検証（検証1）

平成29年度のモニタリング検査で陰性と確認

された血清から、8 検体を無作為抽出し試験に供した。各検体においてはプロトコル通り 10 倍希釈を行い、その後ポジコンを加え段階希釈を行った。混入させたポジコンの希釈倍率は 5 倍、10 倍、20 倍、40 倍とした。以降は通常どおり検査を行い、S/N 比を算出した。

標識抗体の混入の検証（検証 2）

平成 23 年度、27 年度、28 年度及び 29 年度のゲル沈用指示陽性血清計 4 種類を試験に供した。洗浄液で標識抗体の段階希釈を行い、最後の洗浄後、各ウェルに段階希釈をした標識抗体を $2\mu\text{l}$ ずつ添加した。以降は通常どおり検査を行い、S/N 比を算出した。

洗浄液への標識抗体混入（検証 3）

平成 26 年、27 年及び 29 年のゲル沈用指示陽性血清計 3 種類を試験に供した。2,000 倍希釈量の標識抗体が混入した洗浄液で洗浄 2 回目を行い、通常洗浄時と S/N 比の変化を比較した。

廃液の廃棄方法によるプレートや周囲への飛散による混入（検証 4）

机に白紙を敷き、中央に当所で廃液用に使用している 5L のバケツを設置する。バケツには、1 プレートの検査時に、最後の洗浄までにバケツにたまりうる最大の廃液量約 340ml の色水を入れる。プレートの 96 ウェルの全てに洗浄液を $350\mu\text{l}$ ずつ入れ、バケツへ洗浄液を勢いよく除去する。その後、色水の飛散範囲を目視で確認し、混入の原因となりうるかを検証した（図 2）。

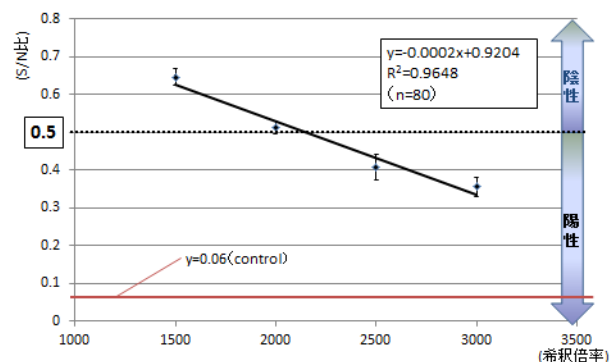


図2 標識抗体を混入させた場合のS/N比

検証結果

検証 1（図 3）

横軸は混入させたポジコンの希釈倍率、縦軸は S/N 比を示す。求められた S/N 比から検量線を作成し、相関係数を求めた。ポジコンを混入させると濃度依存的に吸光度は低下を示し、ポジコンの希釈倍率と S/N 比には正の相関がみられた ($R^2=0.8605$)。ポジコンの希釈倍率が 40 倍以上で S/N 比はコントロールと同程度になり、陰性検体が陽転する希釈倍率は 5 倍以下となった。

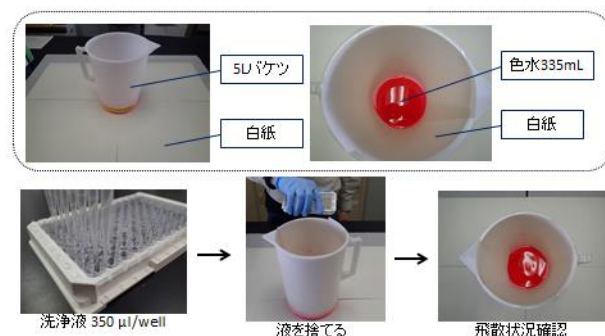


図3 プレートや周囲への飛散による混入の検証

検証 2(図 4)

横軸は混入させた標識抗体の希釈倍率、縦軸は S/N 比を示す。求められた S/N 比から検量線を作成し、相関係数を求めた。標識抗体を混入させると濃度依存的に吸光度は上昇を示し、標識抗体の希釈倍率と S/N 比には負の相関がみられた

($R^2=0.96484$)。検量線より、陽性検体が陰転する標識抗体の希釈倍率は2,102倍以下となった。

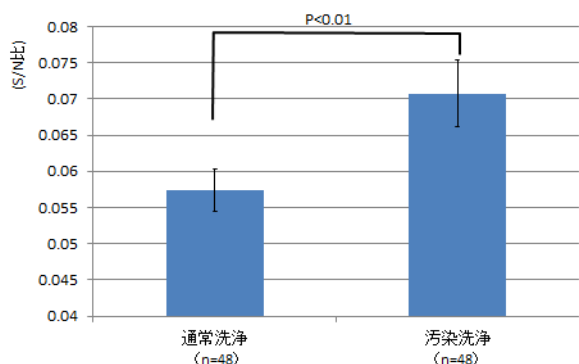


図4 標識抗体を洗浄液に混入させた場合のS/N比

検証3(図5)

標識抗体の混入した洗浄液で洗浄を実施した結果、通常洗浄時と比較してS/N比の上昇が確認された($P < 0.01$)。陽性反応が陰転する程度の変化は見られなかったが、洗浄液への標識抗体の混入は結果に影響を与えることが示唆された。

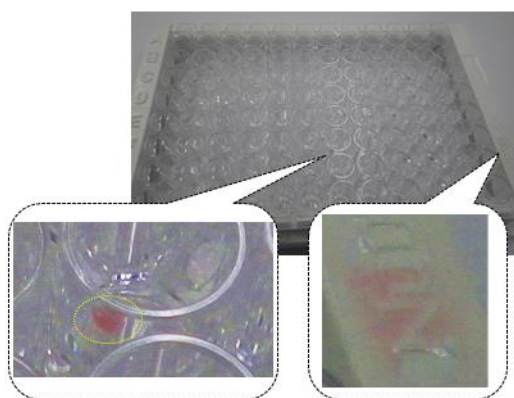


図5 プレートへの跳ね返り

検証4(図6、7)

微量ではあるものの、ウェルの外周及びプレートの縁に色水の跳ね返りが確認された。また、周囲の紙については、計3箇所5mm以下の水滴が確認された。

考察

検証1より、ポジコンの混入により陰性検体

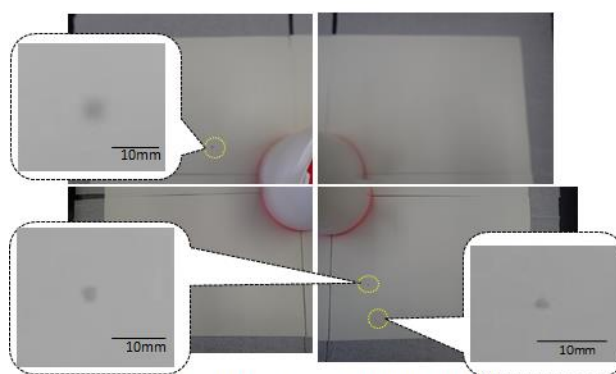


図6 周囲への跳ね返り

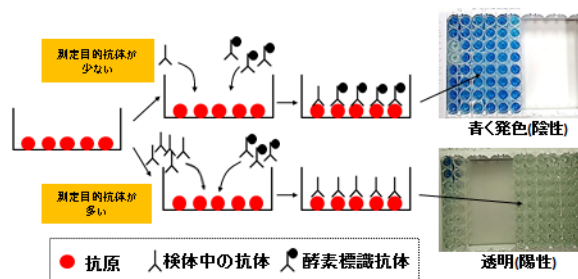


図7 競合エライザ法

が陽転する希釈倍率は5倍以下であった。これは希釈検体 $100\mu\text{l}$ に対してポジコンが $25\mu\text{l}$ 以上混入することに相当する。本検査キットではポジコンは希釈せずに添加することで、目的の吸光度が得られるようになっており、陰性検体にポジコンがある程度混入したとしても、陰性検体を陽転させるリスクは低いことが示唆された。

一方、検証2より、標識抗体の混入により陽性検体が陰転する希釈倍率は2,102倍以下であった。これは基質 $100\mu\text{l}$ に対して標識抗体が $0.05\mu\text{l}$ 混入することに相当し、洗浄後に少量でもウェルに残存すると陽性検体を陰転させることが示唆された。これらの検証結果を比較すると2回目の洗浄後の標識抗体の混入は結果に影響を与えるリスクが高いことは示唆された。

当所では標識抗体を各ウェルへ添加し室温で反

応後、標識抗体を 5L バケツに廃棄し、リザーバーに調製した洗浄液をピペット操作によりプレートへ分注し、廃液の溜まった 5L バケツに洗浄液を廃棄する作業を 5 回実施する (図 8)。この作業における混入経路を分析した結果、チップがウェルの壁面に接触して残存した標識抗体が付着することによる洗浄液の汚染及び廃液中に残存した標識抗体が跳ね返ってウェル内又は洗浄液を汚染する可能性があった。検証 3 より、標識抗体が洗浄液に混入した場合、陽性反応が陰転する程度の変化は見られなかったものの、S/N 比を上昇させ結果に影響を与える可能性が示唆された (図 8)。また、検証 4 より、飛散実験でプレートや周囲への色水の跳ね返りが観察されたことから、混入経路として跳ね返りによるプレートへの混入と、リザーバー内洗浄液への混入の可能性が示唆された。

標識抗体の混入は、検証試験の結果から試験者の不適なピペット操作、洗浄方法によるリザーバー内の洗浄液の汚染及び汚染された廃液の跳ね返りといった技術的な問題点にあることが示唆された。

に除去するとともに廃液を行う際は慎重にバケツへ液を捨て、洗浄後にプレートや作業台への液の跳ね返りがないことを確認し、発見された場合は責任者に対応を相談するよう標準作業手順書 (以下「SOP」) を改訂した。

現在、鳥インフルエンザのエライザ検査に従事する者に対して SOP を周知するとともに、技術的な教育訓練も併せて実施している。また、今回の検証を通して、洗浄作業の技術的な問題が示唆されたことから、他の伝染性疾患のエライザ検査にも今回の対策を適用することにより当所の検査技術の高位平準化を図っていきたい。

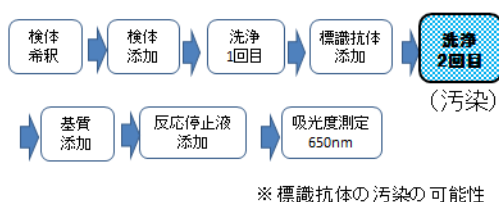


図8 エライザ検査工程

今回得られた結果を踏まえ、2 回目の洗浄を作業工程の重要管理点とし、対策として①チップを壁面に付着させないよう適切にピペットを操作し、チップに標識抗体の付着が疑われた場合は、チップを適時交換すること、②バケツ内の液をこまめ